

令和元年5月29日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18720

研究課題名(和文) 我が国の森林における真核微生物多様性の網羅的評価

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of species diversity of eukaryotic microorganisms inhabiting the forests in Japan

研究代表者

遠藤 力也 (Rikiya, Endoh)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・開発研究員

研究者番号：90634494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は、我が国の森林環境における菌類の多様性を明らかにする新手法の開発に取り組むものである。人工的に調製した菌類擬似群集について、高速シーケンサーMinIONを用いて群集解析を試みた。その結果、MinIONから得られる塩基配列の正確性が低過ぎるため、森林環境に生息する菌類の種数を評価するには不向きと判断した。Loop Genomics社が提供するシーケンスライブラリ調製キット LoopSeqと高速シーケンサーMiSeqを併用することにより、1500 bp程度の正確で長い塩基配列を得られることがわかった。今後、この手法を活用してハイスループットな多様性評価が実現できると見込まれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然が豊かな我が国には、膨大な種数におよぶ微生物が生息していると考えられる。これらは未利用の資源ともとらえられ、その多様性を把握することは微生物資源を利活用する可能性を広げることにつながる。本課題で取り組んだ、高速DNAシーケンサーを用いて正確性が長く長い塩基配列を取得する手法を活用することで、我が国の森林環境が擁する微生物多様性についてより正確な知見が今後蓄積していくものと期待される。

研究成果の概要(英文)：This project has been aimed at developing a new method analyzing fungal diversity in the forest environment in Japan. Mock fungal community was prepared, and then analyzed by using a high-throughput DNA sequencer MinION. Accuracy of the nucleotide sequences obtained from MinION were too low to count up number of species inhabiting in forest environment, leading to a conclusion that MinION is not suitable for evaluation of species diversity. Accordingly, combination of a recently-launched library preparation kit LoopSeq supplied by Loop Genomics Ltd. and sequencing by MiSeq appeared promising, as the procedure would yield very accurate nucleotide sequences of ca. 1500 bp in length. High-throughput evaluation of species diversity would be achieved by using this methodology in the future.

研究分野：微生物資源学

キーワード：生物多様性 カルチャーコレクション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国の森林にはどれくらい多様な真核微生物(菌類)が息づいているのだろうか?

きのこの子実体、地衣類、外生菌根など肉眼で見える菌類とその共生体に限っても、多様性が膨大であることは言うまでもない。実際には、肉眼では見えない菌類(カビ・酵母)のほうに圧倒的に多く、その分子系統的な幅は極めて広い。いまだ人類が分離していない真核微生物は膨大で、それらは微生物資源として未利用の状態にあるといえる。

では、我が国の森林は微生物資源の宝庫として、どれほどのポテンシャルを有するのだろうか? リター分解や窒素循環に関連づけた森林微生物群集の調査、森林生態系における微生物キーストーン種の探索、あるいは、森林昆虫に共生する微生物の探索といった研究は遂行されているが、森林環境全体を対象にした包括的な調査は未だなされていない。微生物多様性を評価するためには高速 DNA シーケンサーによって大量に塩基配列データを取得することが有効な手段である。高速 DNA シーケンサーの駆動が費用面で徐々に手軽なものになりつつある。しかし、高速 DNA シーケンサーによる塩基配列の解読はまだコストが高いうえ、取得できる配列長が短く種の識別に十分な解像度を得にくいという難点がある。例えば、菌類多様性の評価に ITS-5.8S rRNA 遺伝子領域をターゲットにした高速 DNA シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンスが行われてきたが、Illumina 社 MiSeq を用いると解読長が 300 bp 程度となり、ITS 領域全域の半分程度しかカバーできない。一方、Roche 社 454 GS Junior を用いると解読長 600 bp 程度を実現できるが、得られるリード数が 10 万強で比較的少ないという難点があった。

2. 研究の目的

我が国の森林に棲息する真核微生物種を 100%把握することはおそらく不可能であるが、「これ以上は確実に存在する」という 実験的な下限値は検証でき、同時に「これくらいは存在する」という 理論的な下限値も Rarefaction curve から推定できる可能性がある。しかし上述した背景により、従来の研究で用いられてきた手法を改善することを検討する必要がある。このため、高速 DNA シーケンサー MiSeq と 454 GS Junior を併用する解析手法を開発し、シーケンサーから産出される配列データから高精度の α を算出・取得することが本課題の当初の目的であった。また、森林環境から真核微生物のユニークな菌株を樹立し、公的菌株保存機関に寄託して二次利用が可能な状態に整備することも本課題の目的である。

3. 研究の方法

まず、高速 DNA シーケンサーを用いた真核微生物の多様性評価のための解析手法を確立することが必要になる。ランニングコストが比較的安価な 454 GS Junior を用いて森林環境の根圏土壌などから多様性のホットスポットを探索する予定だった。当初、真核微生物の多様性を評価するために、高速 DNA シーケンサー Roche 454 GS Jr. を使用する計画だった。しかし Roche 社による当該機器サポートの終了及び試薬供給の停止に至り、実験の再現性・検証可能性を確保する観点から、塩基配列データの取得に用いるシーケンサーの再検討を余儀なくされた。

Oxford Nanopore 社の提供する新型高速シーケンサー MinION を導入した。本シーケンサーは、長い塩基配列(数千 bp ~)を比較的安価なランニングコストで取得できる。DNA バーコーディング領域である LSU rRNA 遺伝子 D1/D2 領域の塩基配列が既知の菌類約 80 種について、当該領域の PCR アンプリコンを混合し、擬似菌類群集を作成した。これを元にシーケンス用ライブラリを調製し、MinION によって配列を取得した。Albacore v.2.3.1 によってベースコールを行い、生配列(MinION リード)を得て、その後の解析に用いた。

4. 研究成果

MinIONリードについて、レファレンス配列に対する相同性検索の結果をもとに17,402配列をグループリングした (Fig. 1)。その結果、MinIONによる配列取得そのものは良好にできたものの、MinIONリードの正確性が低過ぎる (極めて多く In/del が認められる) ためレファレンス配列とのアラインメントが不良であった (Fig. 2)。

Fig.1. Read grouping to each of 87 references

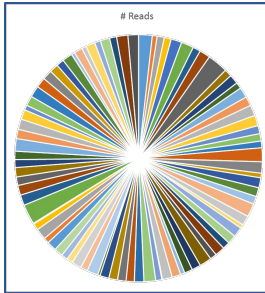
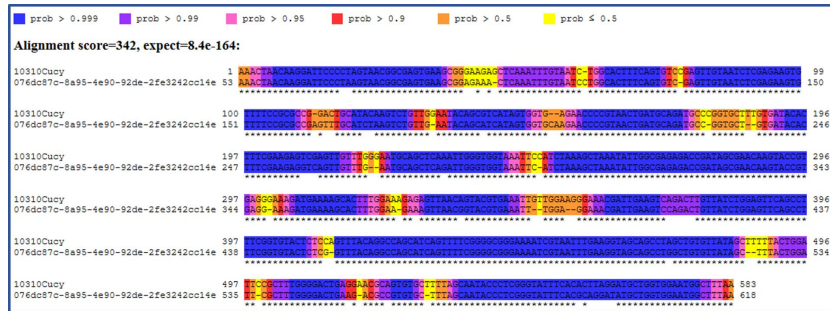


Fig.2. Alignment by LAST using a single MinION raw read



また、MinIONリードを用いてBLASTによる相同性検索を行うと、属レベルの推定にとどまることがわかった。すなわち、野外試料を用いてMinIONによるアンプリコンシーケンスを行う場合、近縁種を区別できない可能性が極めて高い。安価に長い塩基配列を取得できる点でMinIONは魅力的だが、森林環境に生息する真核微生物の“種数”の多様性評価を目指す本課題で援用するには不向きと判断した。

正確で長い塩基配列をハイスループットに取得するため、Loop Genomics社が提供するシーケンスライブラリ調製キット LoopSeqを導入した。上述したような菌類の疑似群集を作成し、ライブラリ調製 (LoopSeq) 配列取得 (MiSeq) アセンブリの手順により、1500 bp程度の正確で長い塩基配列を得られることがわかった。菌類多様性の正確な評価には上記の手順が極めて有効であり、この手法を援用した研究を継続している。供試検体のマルチプレックス化も可能であり、ハイスループットな多様性評価が実現できると見込まれる。

研究の過程でウルシやトベラに穿孔したコキクイムシに随伴する酵母株を収集し、資化性状試験および種同定を行った。ウルシに穿孔したキクイムシから採れた酵母は未記載種と考えられ、Journal of Forest Research 誌に発表した (Masuya et al. 2019)。今後、我が国の森林が擁するユニークな菌類をより広範な基質・環境から培養法によって収集し、その情報を普く発信していくことが課題である。また、国産の酵母菌株がカルチャーコレクションにどれくらい保存されているかを調査し、その結果の一部を発表した (Groenewald et al. 2017)。この過程で、生態が解明されていない酵母類がいかに多いかも解った。今後、野外における酵母類のハビタットに関するデータを取得し、生態解明に資する新規知見を蓄積していくことが課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Kunthiphun, Rikiya Endoh (co-first, corresponding author), Masako Takashima, Moriya Ohkuma, Somboon Tanasupawat, Ancharida Savarajara. *Prototheca paracutis* sp. nov., oleaginous achlorophyllous microalga isolated from a mangrove forest. Mycoscience (2019) 60: 165-169. 査読あり.

DOI: 10.1016/j.myc.2019.02.003

Hayato Masuya, Rikiya Endoh, Yuho Ando, Masanobu Tabata. Fungi associated with *Cryphalus rhusi* (Scolytinae; Coleoptera) infesting lacquer tree, *Toxicodendron vernicifluum*. Journal of Forest Research (2019) 24: 120-124. 査読あり.

DOI: 10.1080/13416979.2018.1564532

Rina Kudo, Hayato Masuya, Rikiya Endoh, Taisei Kikuchi, Hiroshi Ikeda. Gut microbial and fungal communities in ground-dwelling beetles are associated with host food habit and habitat. The ISME Journal (2019) 13: 676-685. 査読あり.

DOI: 10.1038/s41396-018-0298-3

Shen X-X, Opulente DA, Kominek J, Zhou X, Steenwyk JL, Buh KV, Haase MAB, Wisecaver JH, Wang M, Doering DT, Boudouris JT, Schneider RM, Langdon QK, Ohkuma M, Endoh R, Takashima M, Manabe R, Cadez N, Libkind D, Rosa CA, DeVirgilio J, Hulfachor AB, Groenewald M, Kurtzman CP, Hittinger CT, Rokas A. Tempo and mode of genome evolution in the budding yeast subphylum. Cell (2018) 175: 1533-1545.e20. 査読あり.

DOI: 10.1016/j.cell.2018.10.023

Ayumi Tanimura, Takashi Sugita, Rikiya Endoh, Moriya Ohkuma, Shigenobu Kishino, Jun Ogawa, Jun Shima, Masako Takashima. Lipid production via simultaneous conversion of glucose and xylose by a novel yeast, *Cystobasidium iriomotense*. PLoS ONE (2018) 13: e0202164. 査読あり.

DOI: 10.1371/journal.pone.0202164

Shigekatsu Suzuki, Rikiya Endoh, Ri-ichiroh Manabe, Moriya Ohkuma, Yoshihisa Hirakawa. Multiple losses of photosynthesis and convergent reductive genome evolution in the colourless green algae *Prototheca*. Scientific Reports (2018) 8: 940. 査読あり.

DOI: 10.1038/s41598-017-18378-8

Shihomi Uzuhashi, Rikiya Endoh, Ri-ichiroh Manabe, Moriya Ohkuma. Draft genome sequences of the oomycete *Pilasporangium apinafurcum* strains JCM 30513 and JCM 30514, formerly classified as *Pythium apinafurcum*. Genome Announcements (2017) 5: e00899-17. 査読あり.

DOI: 10.1128/genomeA.00899-17

Rumpa Jutakanoke, Rikiya Endoh (co-first, corresponding author), Masako Takashima, Moriya Ohkuma, Somboon Tanasupawat, Ancharida Akaracharanya. *Allodekkera sacchari* gen. nov., sp. nov., a yeast species in the Saccharomycetales isolated from a sugar factory. International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology (2017) 67: 250-255. 査読あり.

DOI: 10.1099/ijsem.0.001607

遠藤 力也, 高島 昌子, 大熊 盛也. 日本に棲息する酵母の種多様性と生物遺伝資源としての期待. 生物工学会誌 (2016) 94: 308-311. 査読なし.

Hayato Masuya, Ri-ichiroh Manabe, Moriya Ohkuma, Rikiya Endoh. Draft genome sequence of *Raffaelea quercivora* JCM 11526, a Japanese oak wilt pathogen associated with the platypodid beetle, *Platypus quercivorus*. Genome Announcements (2016) 4: e00755-16. 査読あり.

DOI: 10.1128/genomeA.00755-16

Sineenath Kunthiphun, Rikiya Endoh (corresponding author), Masako Takashima, Moriya

Ohkuma, Somboon Tanasupawat, Ancharida Akaracharanya. *Trichosporon heliocopridis* sp. nov., a urease-negative basidiomycetous yeast associated with dung beetles (*Helicopriss bucephalus* Fabricius). International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology (2016) 66: 1180-1186. 査読あり .
DOI: 10.1099/ijsem.0.000850

〔学会発表〕(計 14 件)

遠藤 力也, 橋本 陽, 大熊 盛也. ナガキクイムシ共生菌群の分子系統と生理生化学的性状 . 第 130 回日本森林学会大会 . 2019 年 . 新潟 .

Rikiya Endoh, Moriya Ohkuma. Oxford Nanopore MinION sequencing: Is it useful for microbial culture collection? The 10th Asian Network of Research Resource Centers (ANRRC) International Meeting. 2018. Seoul, South Korea.

遠藤 力也, 大熊 盛也. 酵母のフルクトース発酵能 品質管理から見てきた表現型 . 日本微生物資源学会第 25 回大会 . 2018 年 . つくば .

出川 洋介, 平尾 章, 佐藤 幸恵, 山田 宗樹, 恩田 義彦, 遠藤 力也, 大熊 盛也. 菅平高原より分離された *Metschnikowia* 属花蜜酵母 第 2 回環境微生物系学会合同大会 2017 年 . 仙台 .

Rikiya Endoh, Moriya Ohkuma. Toward expansion of strain information on the yeasts in RIKEN BRC-JCM. Joint Meeting of the 9th ANRRC International Meeting & International Microbiome Workshop, Beijing, China. 2017. Beijing, China.

遠藤 力也, 大熊 盛也. 宿主木に飛来するカシノナガキクイムシの消化管から分離される / されない菌類 . 第 128 回日本森林学会大会 . 2017 年 . 鹿児島 .

遠藤 力也. 知られざる野生酵母 . 平成28年度筑波大学公開講座 菌類と昆虫の共生関係 (招待講演) . 2016年 . つくば .

Rikiya Endoh, Ri-ichiroh Manabe, Yukihiro Kinjo, Kouji Suzu, Gen Okada, Masako Takashima, Moriya Ohkuma. Draft genome sequencing of 130 fungal strains under the NBRP genome information upgrading program. The 8th ANRRC International Meeting. 2016. Kyoto, Japan.

Rikiya Endoh, Moriya Ohkuma. Transport of yeast consortium by the forest pest ambrosia beetle *Platypus quercivorus* (Platypodidae, Coleoptera). The 14th International Congress on Yeasts (招待講演) . 2016. Awaji, Japan

遠藤 力也, 眞鍋 理一郎, 金城 幸宏, 鈴 幸二, 高島 昌子, 大熊 盛也. 多様な真核微生物約120株のドラフトゲノム情報の公開とJCMオンラインカタログの利便性向上 . 第11回新産業酵母研究会講演会 (招待講演) . 2016年 . 東京 .

升屋 勇人, 遠藤 力也, 田端 雅進. ウルシを害するツタウルシノコキクイムシの随伴菌 . 第127回日本森林学会大会 . 2016年 . 藤沢 .

遠藤 力也. 森林害虫と酵母の知られざる関係に迫る . 第80回酵母研究会講演会・第3回NBRP シンポジウム合同講演会 (招待講演) . 2015年 . 奈良 .

Rikiya Endoh, Moriya Ohkuma. Toward Establishment of a Unique Yeast Culture Collection. The 7th Asian Network of Research Resource Center (ANRRC) International Meeting. 2015. Incheon, South Korea.

遠藤 力也. 森に微生物資源の宝庫を見つける 知られざる甲虫随伴性酵母たち . 第18

回真核微生物交流会（招待講演）．2015年．東広島．

〔図書〕（計 2件）

Marizeth Groenewald, Kyria Boundy-Mills, Neža Čadež, Rikiya Endoh, Sasitorn Jindamorakot, Carolina Pohl-Albertyn, Carlos A. Rosa, Benedetta Turchetti, Andrey Yurkov. Chapter 15: Census of Yeasts Isolated from Natural Ecosystem and Conserved in Worldwide Collections. In: Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity. pp. 455-476. Springer International Publishing. 2017. eBook ISBN: 978-3-319-62683-3.

遠藤 力也．第 12 章 昆虫と酵母の共生．難培養性微生物研究の最新技術 III 微生物の生き様に迫り課題解決へ 大熊 盛也 野田 悟子 監修 シーエムシー出版．pp. 104-114. 2015 年．

〔産業財産権〕

取得状況（計 1件）

名称： 「油脂産生酵母及び油脂製造方法」

発明者： 鳥 純，谷村 あゆみ，高島 昌子，遠藤 力也，大熊 盛也，杉田 隆

権利者： 同上

種類： 発明

番号： JP2016-034240A

取得年： 2016 年

国内外の別： 国内

〔その他〕

(1) プレスリリース

「バイオマスから油脂を生産する新種の酵母を発見 油脂製造プロセスの効率化と低酸素社会の実現に貢献」．明治薬科大学、龍谷大学、京都大学との共同発表．2018 年 9 月 21 日．http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180921_2/

「緑藻“プロトテカ”が真っ白になった理由」．筑波大学生命環境系，理研ライフサイエンス技術基盤研究センターとの共同発表．2018 年 1 月 17 日．

http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180117_4/

「酵母・カビの設計図の概要が多数明らかに 真核微生物約 120 菌株のドラフトゲノムを解読」．理研ライフサイエンス技術基盤研究センターとの共同発表．2016 年 3 月 1 日．

http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160301_2/

(2) その他

広報誌「理研ニュース 2017 年 3 月号 FACE」に取材記事掲載．

<http://www.riken.jp/~media/riken/pr/publications/news/2017/rn201703.pdf>

6．研究組織

(1)研究分担者 該当なし

(2)研究協力者 該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。